



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 568**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/49** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08804568 .7**  
96 Fecha de presentación : **22.09.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2201365**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Dispositivo microfluídico y método para la determinación del tiempo de coagulación sanguíneo.**

30 Prioridad: **20.09.2007 EP 07380258**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.09.2011**

73 Titular/es: **ILINE MICROSYSTEMS, S.L.**  
**Parque Tecnológico Miramón**  
**Pº Mekeletegi, 56 - Ed. B8 - 1ª Planta**  
**20009 San Sebastian, Gipuzkoa, ES**

72 Inventor/es: **Sádaba Champetier de Ribes, Iñaki y**  
**Peón Eguiguren, Juan Antonio**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 364 568 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico y procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación de un fluido

### 5 Campo de invención

La presente invención se refiere a un dispositivo del tipo "laboratorio en un chip" y al procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación, en particular para la determinación del tiempo de coagulación de sangre. También se refiere a un dispositivo de medida, como un coagulómetro, a utilizar en combinación con el "laboratorio en un chip" de la invención.

#### Antecedentes de la invención

En las personas sanas, la viscosidad y espesor de la sangre se regulan por un proceso conocido como hemostasia. Este mecanismo evita la pérdida de sangre del sistema vascular.

La coagulación sanguínea está regulada por un proceso complejo capaz de detener cualquier sangrado que se produzca en el cuerpo. La formación de coágulos estables se realiza por la interacción de los factores proteínicos de coagulación, los capilares sanguíneos y las plaquetas. Los procesos continúan después de la cicatrización cuando el coágulo se disuelve.

Durante las primeras etapas de la formación de coágulos se agregan las plaquetas, al mismo tiempo en el que se inicia el fenómeno conocido como cascada de coagulación. En este proceso, el fibrinógeno, una proteína soluble en el plasma sanguíneo, se convierte en una red de fibrina insoluble o coágulo sanguíneo. Esta transformación se cataliza por la trombina, una enzima generalmente presente en la sangre en su forma inactiva, la protrombina.

Los desequilibrios en la hemostasia ocasionan alteraciones sanguíneas. Estos pueden ser de origen genético, tales como la hemofilia o la enfermedad de Von Willebrand; desencadenada por otras dolencias tales como el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome de intestino irritable o cáncer; o adquiridos por factores extrínsecos: pacientes que toman anticoagulantes orales como tratamiento o profilaxis de alteraciones tromboticas, cardiopatías o vasculopatías.

La terapia con anticoagulantes orales, como warfarina, es de amplio uso y necesita vigilancia frecuente debido a su bajo índice terapéutico. La dosificación debe ajustarse periódicamente para evitar la trombosis o el riesgo de hemorragia.

Para estos y otros pacientes en condiciones de predisposición conocidas tales como inmovilidad, obesidad, aterosclerosis o aquellos en tratamiento dental o quirúrgico, la disponibilidad de pruebas fiables que les permita vigilar regularmente la coagulación en sus domicilios representaría una alternativa conveniente, rápida y barata frente a los ensayos de coagulación clínicos actualmente disponibles. Tales ensayos también pueden ser empleados como una ayuda preliminar en el diagnóstico de trastornos hemostáticos.

El ensayo de coagulación más habitual en el mundo es el denominado Relación Internacional Normalizada (**INR**). Esta relación se calcula a través del tiempo de protrombina (PT), que es el tiempo transcurrido desde la activación mediante un agente de coagulación hasta el comienzo de la coagulación sanguínea. El agente coagulante es un factor tisular o tromboplastina y este mecanismo se denomina la vía "extrínseca" de coagulación. Debido a las diferencias entre distintos lotes y fabricantes de factor tisular (es un producto de origen biológico), se estableció el **INR** como medio para normalizar los resultados. El INR es el cociente entre el tiempo de protrombina de un paciente respecto al tiempo de protrombina promedio (MNPT) de al menos 20 personas sanas, elevado a la potencia del valor del Índice internacional de sensibilidad (ISI) de la muestra de control utilizada. Cada fabricante proporciona un ISI de cualquier factor tisular comercializado, indicando la manera en que un lote concreto de factor tisular debe compararse con una muestra normalizada internacionalmente.

Hay un segundo tipo de análisis, pero menos comúnmente utilizado, consistente en un mecanismo de coagulación análogo, a través de la vía "intrínseca", y que se denomina Tiempo de protrombina parcial activada (APTT). Estos dos análisis se denominan como tiempos de coagulación en la presente solicitud.

Tradicionalmente, en Europa, estos análisis han sido realizados en los laboratorios, donde se requiere, generalmente, una preparación de la muestra de sangre antes de la determinación del PT. En los últimos años hay una tendencia emergente respecto a la utilización de los dispositivos POC (lugar de atención sanitaria) o similarmente denominados "pruebas cerca del paciente" (NPT) para ser usados directamente por el médico o la enfermera, o autónomamente por el paciente. Estos procedimientos están sustituyendo ampliamente a los tradicionales.

Los procedimientos desarrollados inicialmente y conocidos en el estado de la técnica requieren la extracción de

grandes cantidades de sangre o volúmenes conocidos mediante venopunción, tratamiento posterior de la sangre previo a la realización de la analítica y de personal experto para la realización de los procesos y la interpretación de los resultados. En contraposición, los coagulómetros del lugar de atención sanitaria, denominados también coagulómetros portátiles, solo requieren una gota de sangre completa extraída por punción en el dedo y  
5 proporcionan el resultado de INR de forma inmediata.

La solicitud de patente WO 92/21028 describe un procedimiento de detección basado en el ferromagnetismo. El dispositivo consta de una cámara de coagulación y una cámara de control, cada una de las cuales está acoplada a una paleta de agitación que gira en un campo magnético oscilante. El movimiento de la paleta en la cámara de  
10 coagulación se ralentiza a medida que comienza la coagulación sanguínea y ejerce resistencia contra su movimiento. El tiempo de coagulación se determina cuando cambia el movimiento relativo de las paletas de agitación en las cámaras.

Otros dispositivos, tales como los que aparecen en la patente US 5110727 contienen una muestra de sangre con  
15 partículas metálicas dispersadas en ella. Cuando se aplica un campo magnético oscilante se induce un movimiento de ir y venir que se ralentiza a medida que la sangre coagula. La disminución en la velocidad se correlaciona con el incremento de la viscosidad en la muestra de sangre o el comienzo de la coagulación.

Las solicitudes de patente WO 00/06761 y WO 02/48707 A2 describen dispositivos equipados con electrodos en  
20 contacto con una muestra sanguínea estacionaria y miden, respectivamente, la variación en la conductividad eléctrica y la variación en la corriente a medida que se incrementa la viscosidad de la sangre.

WO 2004/059316 A1 describe un dispositivo de bajo coste y desechable para la determinación del tiempo de  
25 coagulación de la sangre. El dispositivo está equipado con un microsensor, al menos parcialmente en contacto con el fluido y mide la impedancia y la capacitancia de la sangre en el canal donde la sangre coagula y el flujo se para.

Sin embargo, los altos costes de producción asociados con dicho dispositivo restringen su uso como elemento desechable.

30 De este modo, permanece la necesidad de un chip desechable, preciso y de bajo coste y de un procedimiento de detección para las analíticas de coagulación sanguínea para los POC y/o NPT.

Se ha producido un desarrollo en la dirección de pruebas analíticas de tamaños menores, que requieren muestras de sangre completa menores y sin cuantificar, en la escala del microlitro, gracias a los avances en la ciencia de los  
35 materiales y los procedimientos electrónicos y ópticos.

La solicitud de patente WO 2007/025559 A1 revela un dispositivo multicapa para la determinación de la coagulación en una muestra de plasma o de sangre entera, que contiene una o más áreas de detección, todas ellas equipadas con al menos un reactivo de estimulación de la coagulación.  
40

La solicitud de patente US2007/0122849A1 revela una estructura para análisis de una muestra en un chip microfluídico para el análisis cuantitativo y la detección de los analitos.

El documento EP 0394070 B1 describe un dispositivo microfluídico de un canal capilar, optimizado para la  
45 determinación del APTT en una muestra de sangre entera, con un volumen de 40µl y un tiempo de residencia de 200s. El dispositivo utiliza como reactivo una mezcla de un agente activante para la determinación del APTT y una mezcla de fosfolípidos. El procedimiento de detección empleado, a través de la dirección capilar, es visual u óptico, como un LED, y determina el APTT cuando el flujo de sangre se detiene a lo largo del dispositivo.

50 El documento US 6900021 describe un dispositivo microfluídico para realizar estudios in vitro sobre la reacción y los efectos de diferentes componentes de las células. El caudal se controla mediante bombas, diferencias de presión o campos eléctricos, y no por capilaridad en el canal microfluídico. Hay también dos caminos de fluido que se cruzan y combinan con un camino principal para permitir que la reacción transcurra. Sin embargo, el camino principal de flujo no comprende una zona que contenga un reactivo. Además, los reactivos no se incluyen en el chip, sino que se  
55 agregan en diferentes lugares y momentos, esto permite que el chip se utilice en diferentes ensayos de reacción con diferentes reactivos.

A pesar de estos desarrollos, los coagulómetros para el punto de atención sanitaria utilizados en la actualidad tienen importantes inconvenientes;  
60

- aunque la mayor parte de chips o pruebas reactivas utilizadas son desechables, éstos incluyen varios componentes como medios de recogida de la muestra sanguínea, medios para medir el cambio en la conductividad o medios para medir el cambio en la viscosidad. La presencia de componentes activos tales como contactos electroquímicos o partículas oscilantes en la tira hace que la producción del chip sea compleja y costosa. Además, el  
65 tamaño no puede reducirse sin comprometer la calidad de la tira.

– Aunque se han realizado avances respecto de la cantidad de muestra de sangre necesaria para la prueba, el volumen sigue estando en el intervalo de 10  $\mu$ l en el mejor de los casos, que sigue siendo incómodo para el paciente. Esto se compara desfavorablemente con otras pruebas como la medición de glucosa, que se puede  
5 realizar con precisión con una muestra de sangre de 1  $\mu$ l o menos.

– El aparato de detección y medida que se utiliza con las tiras reactivas o chips conocidos sigue siendo bastante complejo. En algunos casos requieren medios adicionales para transportar o mover la muestra de sangre, tal como campos magnéticos o bombas. En otros, el dispositivo requiere varios medios de detección: medios  
10 electroquímicos o magnéticos para determinar algunos cambios de propiedades en la muestra que requieren chips de calibración, y medios de detección adicionales para leer sistemas adicionales de control de calidad incluidos en el dispositivo. Esto aumenta la complejidad y por tanto el coste del dispositivo portátil.

En vista de estos inconvenientes, es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo microfluídico mejorado y un procedimiento de determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido como la sangre o plasma, que requiera sólo los pasos mínimos y pueda así ser usado autónomamente por el paciente. Es otro objeto proporcionar un dispositivo de medida a utilizar con el dispositivo microfluídico, tal como un coagulómetro, para detectar y vigilar el tiempo de coagulación de la sangre y los controles de calidad presentes en el dispositivo microfluídico, que sea de fabricación sencilla, compacto y se pueda utilizar autónomamente por el paciente.  
15  
20

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo microfluídico de bajo coste para la determinación del tiempo de coagulación de un medio fluido como la sangre o plasma de acuerdo con la reivindicación independiente 1.  
25

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo coagulómetro que contiene una ranura para la introducción del dispositivo microfluídico, medios para detectar y/o monitorizar al menos una propiedad del medio fluido y medios para procesar los datos proporcionados por dicho medio de detección y/o monitorización para la determinación del tiempo de coagulación de dicho fluido, de acuerdo con la reivindicación independiente 18.  
30

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido de acuerdo con la reivindicación independiente 24.

En otro aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para la fabricación de un dispositivo microfluídico para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido, de acuerdo con la reivindicación independiente 28.  
35

En las reivindicaciones dependientes se definen las características adicionales favorables.

La presente invención, de este modo, proporciona un dispositivo microfluídico pasivo mejorado de bajo coste de producción y de uso simple, que por tanto pueda ser desechable, para la determinación del tiempo de coagulación de un fluido. Además, el dispositivo microfluídico (tira reactiva), dispositivo de medición (coagulómetro) y el procedimiento de acuerdo con la presente invención, proporcionan un manera adecuada para la determinación del  
40  
45 Tiempo de Protrombina con una muestra mínima de sangre y de esta forma puede utilizarse fácil y autónomamente por el paciente sin el requisito de la extracción mediante venopunción.

Estos y otros aspectos de la invención serán presentados y aclarados con referencia a las realizaciones descritas a partir de ahora en la presente memoria descriptiva.

### 50 Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor y sus numerosos objetos y ventajas aparecerán más claros para aquellos expertos en la materia, por referencia a los siguientes dibujos y la memoria descriptiva que acompaña en los que:

55 La figura 1 muestra una vista en perspectiva en despiece ordenado de una realización del dispositivo de la presente invención, que enseña separadamente las dos capas.

La figura 2 muestra una vista en planta (parte izquierda de la figura) y una vista lateral (parte derecha de la figura) del dispositivo según la realización de la figura 1.

60 La figura 2A muestra una vista en planta de otra realización del dispositivo microfluídico.

La figura 3 muestra una representación gráfica de la superposición de las posiciones de los frentes de flujo en los canales de coagulación y de control.

65

La figura 4 muestra una representación gráfica de la superposición de las velocidades de los frentes de flujo en los canales de coagulación y de control.

La figura 5 muestra de forma esquemática las posiciones de los frentes de flujo anteriores a la coagulación en la realización según la figura 1.

La figura 6 muestra de forma esquemática las posiciones de los frentes de flujo posteriores a la coagulación en la realización según la figura 1.

10 La figura 7 muestra el coeficiente de absorción de la sangre frente a la longitud de onda.

La figura 8 muestra el espectro de emisión de un LED.

15 La figura 9 muestra la curva de respuesta de un fotodiodo optimizado para detectar las longitudes de onda del verde.

La figura 10 muestra la intensidad de la corriente detectada frente al tiempo en dos chips de diferente tamaño para los canales de coagulación y control.

20 La figura 11 muestra las derivadas de las curvas de intensidad de corriente de la figura 10.

La figura 12 muestra la superposición de un serpentín de la realización descrita en la figura 1 y una matriz CCD con un tamaño de píxel de 19x19µm.

25 Las figuras 13 a 16 muestran gráficas de las ecuaciones utilizadas para determinar el tiempo de coagulación mediante curvas teóricas.

La figura 17 muestra datos típicos de la etapa 3 procedentes de pruebas de coagulación reales y tiempos de coagulación determinados siguiendo el procedimiento teórico 1 o 2.

30 En las figuras los números de referencia similares se refieren a elementos similares.

### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona un dispositivo en forma de un chip o tira reactiva desechable, para determinar el tiempo de coagulación de un fluido, tal como sangre o plasma, un aparato de medida a utilizar como coagulómetro portátil con la tira reactiva de la invención, y un procedimiento para determinar el tiempo de coagulación utilizando el dispositivo microfluídico de la invención.

40 Un coagulómetro portátil, como dispositivo para lugar atención al paciente, es una tecnología que sigue cuatro líneas principales de mejoras: reducción de costes, reducción de la muestra de sangre, control de calidad y mejora en la portabilidad. Estos cuatro aspectos son especialmente importantes para una diseminación económica y fiable de las pruebas autorrealizadas por el paciente.

La presente invención tiene ventajas significativas con respecto a las tiras reactivas y coagulómetros portátiles del estado de la técnica:

45 – Reducción de costes: el chip microfluídico desechable es un componente extremadamente simple (pasivo), fabricado con tecnologías y materiales de producción masiva con reducción de costes.

50 – Reducción en el volumen de muestra: se pueden evaluar muestras inferiores a 5 µl mediante la tecnología de chip microfluídico con los controles de calidad y de precisión necesarios.

– Control de calidad: se pueden integrar varios medios de control de calidad en el propio dispositivo desechable de la invención que se pueden leer con un único medio detector. Además, el dispositivo permite utilizar plasmas calibrados como control de calidad externo.

55 – Portabilidad mejorada: los sistemas de detección son extremadamente compactos, de bajo coste, y pueden incluirse en dispositivos portátiles delgados.

60 La invención está basada en el hecho que un canal microfluídico adecuado permite el flujo capilar de la muestra de fluido, ya sea sangre o plasma, permitiendo que la posición o velocidad del frente de fluido se monitorice con precisión mediante medios simples, de forma pasiva, sin contacto con la muestra de fluido. Los cambios reológicos de la muestra de fluido al inicio de la cascada de coagulación (cuando la muestra entra en contacto con el reactivo de coagulación) y en concreto, los cambios en la viscosidad aparente como criterio de valoración de la coagulación final, tienen un efecto significativo para la monitorización de los parámetros dinámicos.

65

Estos parámetros se pueden monitorizar con el mismo medio de detección simple, y compararse bien con una muestra de control que no contiene reactivo de coagulación, o que contiene un reactivo de control diferente, o alternativamente con un valor teórico de predicción.

5 Sin desear quedar vinculado a teoría alguna, los inventores creen que el sistema microfluídico de la invención imita de alguna forma la estructura microcapilar de los capilares sanguíneos así como la dinámica del flujo sanguíneo. Debido a la complejidad y elevada sensibilidad de las etapas de coagulación de la sangre (iniciación, amplificación, propagación y formación del coágulo) resulta muy adecuado para reproducir tan idénticamente como sea posible el entorno de la hemostasia in vivo. Según un informe publicado procedente de la Universidad de Chicago [Kastrup, C. 10 J. Runyon, M. K. Shen, F. Ismagilov, R. F. *Modular chemical mechanism predicts spatiotemporal dynamics of initiation in the complex network of hemostasis*, Departamento de Química e Instituto de Dinámica Biofísica, Universidad de Chicago, editado por George M. Whitesides, Universidad de Harvard], un entorno microfluídico in vitro puede imitar el comportamiento de coagulación de la sangre real en los capilares humanos, los que se ha demostrado que es crítico para determinar los tiempos de coagulación.

15 Además, esta invención permite la monitorización continua de la dinámica de flujo a medida que se detectan los cambios moleculares hemostáticos, proporcionando una elevada precisión y reproducibilidad. En particular, la formación de la primera fibrina insoluble tienen un efecto que se puede medir sobre las propiedades reológicas debido al tamaño de la estructura microcapilar.

20 Como se muestra en la figura 1, el dispositivo microfluídico de la invención en un montaje bicapa que comprende un sustrato plano inferior y una capa de protección. Sobre el sustrato inferior se estampa un sistema de distribución de muestra, dando como resultado una serie de canales o conductos, conectados por un extremo mediante un medio adecuado con una zona de entrada de muestra.

25 Los canales inducen un flujo por capilaridad. La persona experta será capaz de ajustar el tamaño y la forma del canal estampado en el sustrato inferior para obtener una posición o velocidad del flujo que se pueden monitorizar con precisión. Para crear un flujo capilar de la muestra de fluido, se necesita una superficie hidrofílica en el canal, de forma que se induzca una presión negativa suficiente. Esta superficie hidrofílica puede estar presente en el sustrato 30 inferior o en la capa de protección.

El sustrato inferior puede ser de plástico. Si el plástico es hidrófobo, la hidrofilia del canal debe inducirse por medios conocidos de la persona experta tal como un tratamiento químico, revestimiento químico o tratamiento de plasma, para obtener la energía o ángulo de contacto deseados para la superficie.

35 La superficie hidrófila puede ser aportada por la capa de protección que sella los canales microfluídicos estampados en el sustrato inferior. Según esto, bien el material hidrófilo se selecciona como la capa de protección, o bien es un material que se ha sometido a un tratamiento hidrófilo como se ha descrito anteriormente.

40 Alternativamente, las propiedades hidrófilas se proporcionan a la capa superior mediante el adhesivo usado para pegar ambas capas que forman el chip. En ese caso, es importante que el revestimiento adhesivo seleccionado no reaccione con la muestra de fluido ni interfiera con la reacción de coagulación.

De este modo, la capa de protección puede estar comprendida por películas polimérica de adhesivo de varios tipos, 45 tal como adhesivos termosellables y sensibles a la presión. Se pueden utilizar formulaciones hidrófilas, con tensioactivos agregados al adhesivo. Se prefieren los adhesivos duros, para evitar el bloqueo de los canales por un flujo excesivo durante la etapa de sellado o debido a ondulaciones.

Las figuras 2 y 2A muestran una vista en planta de diferentes realizaciones del dispositivo microfluídico de la 50 invención, dicho dispositivo contiene los componentes descritos a continuación.

Medios (1) para introducir una muestra de medio fluido, constituidos esencialmente por un puerto de entrada. Este puerto de entrada está unido a un canal capilar de distribución (2), seguido de una bifurcación del canal (3) que separa el canal de distribución (2) en una primera (6a) y una segunda región (6b), que permite a dicho medio fluido 55 fluir a través de la longitud de dichas regiones. Opcionalmente, el canal de distribución contiene un filtro de separación de células (sólo indicado en la figura 1).

En una realización preferida, dichas primera (6a) y segunda (6b) regiones tienen estructuras idénticas.

60 Cada una de las mencionadas regiones (6a y 6b) contienen, en orden desde el canal de distribución, primero un área (5a, 5b) y al menos, un canal microfluídico, que se denominará en el presente documento como área de escaneado (8). La primera área (5a) contiene un primer reactivo capaz de reaccionar con dicho medio fluido y hace que el canal microfluídico en la región (6a) actúe como un canal de reacción, mientras que la segunda área (5b) bien está vacía o contiene un reactivo diferente, de forma que el canal microfluídico en la región (6b) funciona como canal 65 de control. Preferiblemente, dicho primer reactivo es capaz de iniciar la coagulación de dicho medio fluido.

En el chip pueden aparecer más de dos regiones. Una de las regiones funciona como canal de reacción como se ha explicado anteriormente, y los otros dos o más son canales de control.

5 Para el control de calidad en el propio dispositivo, la muestra de sangre se impulsa capilarmente a lo largo de los canales de control en donde las cámaras de reacción tienen compuestos específicos que proporcionan tiempos de coagulación fijados (o en un intervalo estrecho). Por ejemplo, se pueden incorporar dos de ese tipo de controles, control normalizado y control anormal, para proporcionar una referencia superior e inferior de los tiempos de coagulación.

10

Los canales de control tienen una composición de reactivo distinta del reactivo presente en el canal de reacción. De este modo en una realización, hay un canal de control normalizado, el reactivo presente en el mismo puede ser por ejemplo algún factor de coagulación dependiente de la vitamina K. Factores de coagulación de ese tipo pueden proceder de una combinación seca o liofilizada de plasmas normales de pacientes.

15

Se puede proporcionar un canal de control anormal que comprende un inhibidor del factor de coagulación tal como, heparinas, citratos, oxalatos, EDTA y similares. Además, puede comprender los mismos factores de coagulación dependientes de la vitamina K que en el canal de control normalizado.

20 Siguen a continuación ejemplos ilustrativos que describen las regiones y su funcionalidad:

- 2 regiones: un canal de reacción por determinación del tiempo de coagulación de una muestra de sangre con respecto a un canal de control sin agente coagulante o con un agente inhibidor de la coagulación.
- 2 regiones: un canal de reacción por determinación del tiempo de coagulación de una muestra de sangre mediante curvas teóricas y un canal de control que proporciona tiempos de coagulación normalizados.
- 3 regiones: un canal de reacción por determinación del tiempo de coagulación de una muestra de sangre con respecto a un canal de control sin agente coagulante o con un agente inhibidor de la coagulación. Adicionalmente, un canal de control que proporciona tiempos de coagulación normalizados.
- 3 regiones: un canal de reacción por determinación del tiempo de coagulación de una muestra de sangre mediante comparación con una curva teórica. Adicionalmente, otro canal de control que proporciona tiempos de coagulación normalizados y otro canal de control que proporciona tiempos de coagulación anormalmente elevados.

En el dispositivo de la invención, el flujo es impulsado por fuerzas capilares únicamente y de esta forma el chip o tira reactiva es un dispositivo pasivo que no necesita de fuerzas externas. La hidrofilia de la superficie de los canales permite al menisco humectante delantero del fluido moverse a lo largo de los canales hacia las presiones capilares negativas, mientras que el menisco dehumectante trasero se mantiene en el puerto de entrada. El flujo se detiene en las válvulas de parada inducidas mediante una superficie hidrófoba o mediante una apertura diseñada en los canales. En una realización preferida, cada región (6a, 6b) contiene un medio (7) para la ventilación, más preferiblemente un puerto de ventilación, que a su vez funciona como una válvula de parada del flujo. Aunque representada gráficamente al final del canal de la figura 2, los puertos de ventilación (7) pueden estar ubicados en otras posiciones a lo largo de los canales microfluidicos. Por ejemplo, mediante la conexión de los puertos de ventilación (7) a las detenciones de fluido a la salida de las cámaras de reacción permite que la aceleración del flujo capilar sea máxima en ese punto. En otras realizaciones, cada canal tiene más de un puerto de ventilación (7), permitiendo los puertos de ventilación (7) controlar y modular la velocidad y las propiedades de fluidez del fluido.

Por lo menos una propiedad del medio fluido, preferiblemente la posición o la velocidad del frente del fluido, se monitoriza como un medio fluido transportado a través de las áreas de escaneado (8) de la primera (6a) y segunda (6b) región y terceras regiones opcionales. La comparación entre dichas propiedades en dichas ambas regiones permite la detección del momento cuando la reacción en la primera región (6a) ha tenido lugar y la determinación del tiempo de coagulación para la muestra de fluido. Estas regiones son preferiblemente canales capilares.

Los principios de trabajo de este dispositivo se basan en la microfluidica, para la cual los principios que gobiernan difieren radicalmente de la teoría de flujo convencional, debido a la miniaturización de la escala del sistema.

55

### *Principios Gobernantes*

El llenado dinámico, según el comportamiento newtoniano, de un conducto capilar de sección constante puede determinarse a través del caudal volumétrico  $Q$ , que depende de la viscosidad  $\eta$ , de la resistencia total del flujo  $R_{FR}$  y de la diferencia de presión  $\Delta P$ , existente entre el menisco humectante (delantero) y el menisco dehumectante (trasero) del fluido.

60

$$Q = \frac{1}{\eta} \frac{\Delta P}{R_{FR}} \quad (1)$$

Para un canal de longitud "L" y una sección rectangular A, con anchura "a" y profundidad "b", la resistencia del flujo  $R_{FR}$  puede ser expresada como:

$$R_{FR} = \left[ \frac{1}{12} \left( 1 + \frac{5a}{6b} \right) \frac{AR_H^2}{L} \right]^{-1} \quad (2)$$

donde " $R_H$ " es el radio hidráulico y se define como.  $R_H = \frac{ab}{2(a+b)}$

5 Para determinar  $L=L(t)$ , es decir, la posición del frente del flujo con el tiempo, se requiere la integración de la ecuación (1) con respecto al tiempo. Así, L y la velocidad, calculada como la derivada de L respecto del tiempo, son expresadas como:

$$L(t) = \sqrt{\frac{2\Delta P \left( \frac{1}{12} \left( 1 + \frac{5a}{6b} \right) \right) R_H^2 t}{\eta}} \quad (3)$$

$$\frac{dL}{dt} = \sqrt{\frac{\Delta P \left( \frac{1}{12} \left( 1 + \frac{5a}{6b} \right) \right) R_H^2}{2\eta t}}$$

10 Estas son las ecuaciones que gobiernan el flujo antes de la coagulación donde se asume que la viscosidad es constante. Cuando se inicia la coagulación la viscosidad es una función del tiempo, presentando un incremento exponencial, con lo que según la ecuación (1), el caudal, que es inversamente proporcional a la viscosidad sufrirá, una repentina disminución. Las curvas L(t) y las derivadas mostradas en otras secciones se han determinado numéricamente para una viscosidad variable.

15 Con las ecuaciones (1) a (3) es posible producir un diseño preliminar de las longitudes necesarias de los canales para permitir un flujo permanente para los tiempos mayores de coagulación. El volumen de sangre "V" de un conducto de sección constante puede estimarse de la siguiente forma:

20 
$$V = a \cdot b \cdot L(t) \quad (4)$$

De esta manera, el dispositivo debe diseñarse y el tamaño de los canales escogerse en función de la relación existente (4) entre los parámetros geométricos de los canales, a, b, y L, el volumen de muestra requerido y el tiempo máximo de coagulación.

25 *Determinación del tiempo de coagulación mediante curvas teóricas*

Aprovechando la vigilancia continua de la dinámica de flujo, el tiempo de coagulación se puede determinar o controlar por comparación de la propiedad medida en la muestra con el valor teórico de predicción.

30 Como el comportamiento dinámico se predice bien antes de la coagulación, el tiempo de coagulación se puede determinar como el instante en que la curva de coagulación monitorizada se desvía más allá de un umbral particular de la curva teórica calculada con las ecuaciones (3). Se pueden aplicar unas pocas operaciones matemáticas de forma que dicha desviación dependa únicamente del comportamiento dinámico cualitativo del flujo y no del  
35 cuantitativo. Se describen a continuación dos enfoques análogos pero diferentes.

Procedimiento 1:

**Paso 1:**

40 Según la ecuación (3) para la longitud capilar en comportamiento newtoniano, L (t) es una función potencial del tiempo. Partiendo de los valores de L (t) y t extraídos del sistema de detección, se puede construir la siguiente curva:

$$L(t) = Kt^{0.5} \quad (5)$$

45 La curva monitorizada (canal de coagulación) y la curva teórica se representan gráficamente en el gráfico mostrado en la figura 13.

**Paso 2:**



Aplicando logaritmos a ambos lados de la expresión indicada, se obtiene una curva linear de pendiente 0,5 (véase también el gráfico de la figura 14):

5 
$$\text{Log}L(t) = \log K + 0,5 \log t \quad (6)$$

El término cuantitativo es  $\log K$  y el cualitativo es  $0,5 \log t$ .

**Paso 3:**

10 Por cambio de la variable ( $u=\log t$ ) se puede definir una nueva función  $Y=Y(u)$ , que al derivarla con respecto a  $u$  (ver también el gráfico de la figura 15):

15 
$$Y(u) = \log K + 0,5 u \quad (7)$$

$$\frac{dY}{du} = 0,5 \quad (8)$$

**Paso 4:**

Se realiza por segunda vez la diferenciación de  $Y$  con respecto a  $u$  (figura 16):

20 
$$\frac{d^2Y}{du^2} = 0 \quad (9)$$

La disminución del valor constante por debajo de un valor predefinido en las curvas tanto de la velocidad ( $\frac{dY}{du}$ ) o como de la aceleración ( $\frac{d^2Y}{du^2}$ ), determina el tiempo de coagulación. Las operaciones anteriores mencionadas son la base matemática de un algoritmo que permite la determinación del tiempo de coagulación mediante un solo canal de coagulación independiente.

El chip microfluídico de la presente invención está diseñado de de forma que la sangre fluida tenga un comportamiento predominantemente newtoniano antes de la coagulación. La desviación de este comportamiento es debida únicamente al efecto pseudoplástico, que puede aparecer a caudales bajos. Si esto sucede, el procedimiento sigue siendo de aplicación y funciona razonablemente bien porque dicho efecto pseudoplástico es mucho más débil que el efecto de coagulación, y se puede distinguir en las curvas de aceleración.

Procedimiento 2:

35 Un segundo enfoque matemático para la determinación teórica del tiempo de coagulación se puede describir brevemente de la siguiente forma. Partiendo de los mismos datos brutos, los valores de  $L(t)$  y  $t$  obtenidos en el paso 1, se puede construir la siguiente curva:

40 
$$\eta \propto \frac{L^2}{t} \quad (10)$$

Esta curva es proporcional a la viscosidad ( $\eta$ ) como se puede derivar de la ecuación (3). Los siguientes pasos (2, 3 y 4) se aplican idénticamente como antes (es decir, aplicación de logaritmos, primera derivada y segunda derivada), de forma que se construyen las curvas de la velocidad y la aceleración.

45 Basados en datos de pruebas reales, ambos procedimientos proporcionan aproximadamente el mismo tiempo de coagulación (PT). Un resultado sorprendente encontrado en prácticamente todas las curvas monitorizadas, como las mostradas en el gráfico de la figura 17, fue un comportamiento inicialmente inesperado que era opuesto al efecto de coagulación, véanse las zonas destacadas en ambas curvas con la indicación "inversión". Este efecto es, de hecho, una disminución transitoria de la viscosidad de aproximadamente 1 o 2 segundos de duración que se ve siempre  
50 junto antes del tiempo de coagulación. Este comportamiento proporciona una identificación más fácil del tiempo de coagulación ya que el instante PT se convierte en un claro punto de inflexión, tanto un máximo en el procedimiento 1 o un mínimo en el procedimiento 2. Aunque se desconoce la razón de este comportamiento inesperado, algunas evidencias sugieren que esto se debe a la formación de monómeros de fibrina insolubles acoplados con el efecto Fahraeus-Lindqvist, que reduce la viscosidad aparente antes de la formación de polímeros de fibrina.

55 Además de para la determinación del tiempo de coagulación, el enfoque teórico anteriormente descrito se puede utilizar también para control de calidad mediante correlación de las curvas de prueba con las predicciones teóricas.

Con un operador normal (es decir, sin mal uso del paciente) y condiciones del dispositivo correctas, el flujo de la muestra de sangre antes de coagular debe estar próximo al mencionado comportamiento lineal. Cualquier desviación significativa de dicho comportamiento se puede detectar y procesar por el sistema de monitorización del fluido, provocando una orden de cancelación de la prueba.

5

El medio fluido es sangre, preferiblemente sangre capilar completa de un pinchazo en la punta del dedo del paciente, y se puede usar plasma calibrado con tiempos de coagulación conocidos para control de calidad externo. El reactivo capaz de reaccionar con dicho medio fluido es un reactivo de coagulación, más preferiblemente un factor tisular o tromboplastina.

10 En este caso, el dispositivo y procedimiento de la invención son particularmente adecuados para determinar el tiempo de protrombina, es decir, el tiempo transcurrido entre la activación de la coagulación y el inicio de la coagulación.

El dispositivo puede estar diseñado conforme a los valores estándar de INR; el intervalo más alto de INR recomendado es de aproximadamente 8, lo que significa que el tiempo de protrombina es de unos 100 segundos. Las dimensiones que se requieren para alcanzar dicho máximo de INR se presentan en la Tabla 1. Tal como se ha mencionado previamente, las dimensiones que se necesitan y los volúmenes totales " $V_t$ " para el diseño de diferentes conductos vienen gobernados por la ecuación (3).

15

	a(mm)	b(mm)	L(mm)	$V_t(\mu\text{L})$
Diseño microfluídico	0,08	0,08	150	1,0
Diseño microfluídico	0,125	0,125	250	3,9
Diseño intermedio	0,5	0,5	500	125
Diseño convencional	1	1	700	700

20

Tabla 1. Longitudes necesarias y volúmenes totales " $V_t$ " de diferentes diseños de conductos para alcanzar el máximo del intervalo de INR (100 s.)

Esta tabla demuestra que simplemente, por miniaturizar el diseño fluídico al tamaño de microescala, el rango estándar de INR puede alcanzarse con sólo una gota de sangre.

25

La forma y las dimensiones de los canales de acuerdo con la presente invención permiten la determinación del tiempo de coagulación de una muestra de sangre de no más de 15  $\mu\text{L}$ , y el volumen total utilizado cuando todos los circuitos están llenos es menos de 10  $\mu\text{L}$  permitiendo la permanencia del volumen restante dentro del puerto de entrada, que es necesario para fijar el menisco dehumectante trasero en el puerto de entrada. Los canales microfluídicos permiten un flujo continuo, que va desde varios segundos hasta más de cien segundos, permitiendo la determinación del PT a lo largo de todo el intervalo de tiempo. De este modo, el chip y procedimiento de la invención permiten la medida de tiempos de coagulación precisos y la determinación de INR con un pequeño volumen de muestra de sangre, preferiblemente inferior a 10  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente inferior a 5  $\mu\text{L}$ , y lo más preferiblemente inferior a 1  $\mu\text{L}$  o menos. Esto es muy importante para la comodidad del paciente.

30

35

La longitud de los canales capilares (6a, 6b) debe ser suficientemente larga para permitir que la reacción del reactivo con el fluido se complete antes de que el frente del fluido llegue al final del canal. En la realización preferida, los canales capilares (6a, 6b) tienen forma curvada, más preferiblemente con una forma tipo serpentín, de forma que se minimice el área del dispositivo mientras se mantiene la longitud de los canales.

40

La sección transversal preferida de los canales es de tipo rectangular debido a restricción de fabricación de los mismos, permitiendo una geometría 2D pura lo que simplifica los procesos de fabricación del molde. Las dimensiones específicas tienen que calcularse cuidadosamente ya que el flujo dinámico y el volumen total empleado son muy sensibles a las dimensiones del canal. Como se ve en el presente documento, los valores dimensionales muy por encima de 100  $\mu\text{m}$  necesitan longitudes muy largas para permitir que el flujo se mantenga hasta los tiempos de coagulación más elevados y se necesitan volúmenes de sangre mucho mayores. Con un diseño microfluídico, o en otras palabras, canales con secciones transversales con dimensiones de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  o inferiores, las longitudes de canal se pueden reducir con poco uso de sangre. Adicionalmente, el tamaño del chip y su coste también se reducen considerablemente.

45

50

Preferiblemente, los canales de reacción y control tienen una sección transversal en la que  $a = b$ . En ese caso,  $a$  y  $b$  están comprendidos preferiblemente entre 30 y 125  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 50 y 100  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferiblemente de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ .

55

También las dimensiones del área que contiene el reactivo, preferiblemente una celda de reacción, debe ser apropiada para permitir un volumen suficiente para dispensar el reactivo en estado líquido. Además, el diseño tiene que estar definido de forma que el tiempo de difusión permita alcanzar una concentración suficiente de reactivo para maximizar el volumen de sangre activado. Esto se puede conseguir maximizando la relación de la superficie con volumen dentro de la cámara de reacción. Preferiblemente, el diseño de la huella de la cámara debería ser circular

60

para adaptarla a la forma de la gotícula dispensada, con dimensiones entre 1 y 4 mm de diámetro y una altura entre 40 y 150  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, el diámetro es de aproximadamente 1,5 mm y la altura de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ .

- 5 La dimensión de altura del canal de distribución tiene preferiblemente entre 150  $\mu\text{m}$  y 350  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ .

El puerto de entrada de sangre es preferiblemente el hueco dejado entre los sustratos cubierta y base en el borde del chip, sobre el canal de distribución, y por tanto puede tener la altura de dicho canal de distribución. El volumen dispuesto en el canal de distribución debe ser ligeramente superior que el volumen dispuesto en la posterior estructura capilar, de manera que una vez que el canal de distribución esté completamente lleno con fluido nunca pueda vaciarse. Este volumen define el requisito del volumen mínimo de la muestra de ensayo.

15 Para satisfacer los requisitos de construcción y las limitaciones dimensionales, el caudal volumétrico Q se puede modificar a través de la introducción de válvulas de control de flujo pasivas modificando la sección transversal de los canales microfluídicos, por ejemplo, estrechando segmentos de los canales microfluídicos o introduciendo canales microfluídicos ahusados.

Operación del dispositivo microfluídico

20 La presente invención requiere aplicar una muestra de sangre o plasma en el puerto de entrada, a través del cual la sangre o plasma entra al canal de distribución, donde la muestra de sangre o plasma se divide en un canal de reacción/coagulación y un canal de control.

25 A un tiempo  $t_m$  anterior a la coagulación de la sangre la posición del frente de flujo en ambos canales puede venir representada de la manera siguiente:

$$\begin{aligned} L &= L(t_m) \\ L' &= L'(t_m) \end{aligned} \quad (11)$$

30 Donde L y L' son la posición de coagulación y la de control respectivamente. El tiempo  $t=0$  es el instante en el que el flujo sale de la celda de reacción en el canal de coagulación, en el momento donde el factor tisular o tromboplastina ha sido completamente mezclado y se han iniciado los mecanismos de reacción.

35 El flujo dividido tiene una dinámica de movimientos idéntica hasta que se inicia la coagulación en el canal de reacción. Este instante, cuando se produce el primer coágulo, se identifica como el Tiempo de Protrombina, e induce un repentino incremento de viscosidad. En este mismo instante, la dinámica de flujo a lo largo del canal de reacción se decelera con respecto al canal, o canales, de control. Mediante una monitorización en continuo (8) se pueden calcular la posición del frente de flujo en función del tiempo y la derivada de la posición respecto al tiempo que se denomina la velocidad del frente del flujo.

En la figura 3, se ilustra como pueden ser identificados las posiciones del frente del flujo en dos canales y el tiempo de protrombina. Estas curvas han sido numéricamente calculadas con las siguientes suposiciones, donde a, b,  $\eta$  y PT, son las variables anteriormente indicadas y  $\gamma$  es la tensión superficial de la sangre.

45

$\gamma$ (N/m)	0,05589	Ángulo de contacto	35
a (m)	0,000125	$\eta$ (Pa s)	0,003
b (m)	0,000125	PT	25 s

Tabla 2. Suposiciones para los cálculos numéricos

50 Antes del PT, la diferencia entre ambos canales debe ser mínima, únicamente afectada por las condiciones no uniformes del entorno, tolerancias de fabricación y ruidos en la detección. Se han preferido las curvas de las derivadas respecto al tiempo ya que son más sensibles a los cambios de viscosidad, que se denominan frente de velocidades. Análogamente, en el tiempo  $t_m$ , previo al PT, la monitorización de las velocidades para la coagulación (V) y el control (V') serán:

55

$$\begin{aligned} V &= V(t_m) \\ V' &= V'(t_m) \end{aligned} \quad (12)$$

Estas curvas se muestran en la figura 4.

60 El PT se puede determinar definiendo un umbral "Δ" adecuado para las diferencias entre las velocidades  $V(t_m)$ - $V'(t_m)$ . Antes del PT, la viscosidad es constante y las posiciones y velocidades del frente de flujo tienen diferencias

mínimas tal y como se puede observar esquemáticamente en la figura 5.  
En el tiempo  $t_p$  la diferencia de velocidad sobrepasa el umbral (ver figura 6) y este es el instante del PT.

#### *Medios de detección*

5

Para realizar una detección o monitorización continua del movimiento del frente de flujo  $L=L(t)$  o  $v=v(t)$ , se pueden usar técnicas de detección diferentes:

- Detección mediante un fotodiodo
- Detección mediante sensores ópticos tales como un dispositivo de carga acoplada (CCD) o de semiconductor metal-óxido complementario (CMOS).

10

El coeficiente de absorción de la sangre se muestra en la figura 7. Se puede observar que absorbe especialmente a 400 nm y también en las proximidades del verde (530 nm).

15

#### *Detección mediante Fotodiodo*

El serpentín es iluminado con un LED y la luz transmitida se detecta con el fotodiodo. El frente de flujo en movimiento produce un incremento lineal de la absorción, y por tanto, la intensidad detectada se verá reducida en la misma proporción. Con un amplificador de señal se pueden monitorizar incrementos minúsculos de la posición del frente.

20

A continuación se muestran los cálculos realizados para evaluar la viabilidad de esta estrategia de detección, utilizando componentes estándar de bajo coste.

25

Se han seleccionado un LED y un fotodiodo de bajo coste de distribuidoras comerciales.

El LED mide 3 mm y emite en un ángulo de  $20^\circ$ . La intensidad es 15000 mcd = 0,0309 W/str, por tanto, tomando el ángulo sólido total de  $20^\circ$ , es decir 0,095 str, la potencia de emisión total alcanza 0,00294 W.

30

El espectro de emisión del LED y la curva de respuesta del fotodiodo, que es un fotodiodo estándar de silicio pero optimizado para detectar en las longitudes de onda del verde, se muestran en las figuras 8 y 9.

Con estas hipótesis y tomando adicionalmente el área de escaneado (8), las dimensiones de los canales y la curva  $L(t)$  real de la figura 3, se puede obtener la intensidad de la señal detectada por el fotodiodo. Por razones de simplicidad, se ha asumido también que el chip es perfectamente transparente y que no se producen reflexiones de Fresnel. La intensidad de la señal, que aparece en la figura 10, contiene también una simulación aleatoria de ruido debido a corriente oscura de 20picoA, tal como especifica por el fabricante. Esta curva corresponde a una sección de canal de  $250 \times 250 \mu\text{m}$ . Calculando la derivada de la intensidad de la señal respecto al tiempo, se obtiene la señal proporcional a la velocidad del flujo, como se muestra en la figura 11.

35

40

Con las dos gráficas mostradas (figuras 10 y 11) se ha demostrado que la monitorización del movimiento del frente de flujo es viable, con una sensibilidad suficiente, como se puede deducir por el insignificante ruido visible en las curvas. Además, el tiempo de respuesta del fotodiodo es muy rápido, lo que permite una frecuencia de muestreo de 10 Mhz y el propio amplificador está limitado a 10 KHz. Estos valores son varios órdenes de magnitud más altos que la frecuencia necesaria para una monitorización precisa, cuantificada entorno a 20 Hz.

45

#### *Detección mediante sensores ópticos*

Con esta estrategia de detección, el sistema requiere una configuración muy similar a la anterior pero sustituyendo al dispositivo de detección. En este caso, se emplea un sensor CCD o un sensor CMOS, y por tanto la posición del frente del flujo se obtiene procesando los datos adquiridos en el mapeado a alta frecuencia de la superficie barrida.

50

El dispositivo LED puede ser idéntico al definido en el caso anterior. De forma interesante, en este caso no se requiere una sensibilidad alta, ya que cada célula o píxel del CCD ha de detectar únicamente la presencia o ausencia de fluido en esa posición. Como se muestra en la figura 12, al superponer el área efectiva del CCD sobre el serpentín, la imagen mapeada que capta el CCD permitiría la identificación del frente del flujo y el tiempo de respuesta con resolución suficiente ( $>1$  KHz).

55

Esta técnica requiere el procesado de imágenes, de forma que se pueda identificar en una imagen relativamente borrosa la posición del menisco. Esto aumenta la complejidad del sistema de monitorización. Sin embargo, y en contraste con la estrategia de detección que emplea el fotodiodo, la sensibilidad de cada célula es mucho menos exigente, lo que favorece la estrategia que emplea el CCD.

60

Para mejorar la calidad de la señal a detectar, los medios ópticos, como las lentes, pueden estar integradas. En la

65

actualizad se comercializan a bajo coste bloques rígidos que integran lentes y sensores, como en las cámaras miniaturizadas habituales en la industria de móviles. Estos bloques miden solo unos pocos milímetros y por tanto permiten una integración muy estrecha y compacta en los sistemas portátiles, como el coagulómetro portátil.

5 La señal detectada se procesa mediante el microprocesador con un programa informático incorporado. Se generan las curvas de datos del flujo dinámico y se utilizan los algoritmos para determinar el tiempo de coagulación y también para diferentes controles de calidad. Como se ha explicado anteriormente, el chip (tira reactiva) y el procedimiento de la invención tienen otra ventaja significativa, ya que el mismo medio de detección puede usarse para monitorizar el flujo de la muestra fluida y para realizar diferentes tareas de control de calidad.

10

Cuando el medio de detección está incorporado a un medio de visión artificial, tal como un sensor o microcámara CCD/CMOS, se pueden llevar a cabo tres controles de calidad principales, habituales en las tiras reactivas para coagulómetros, mediante el procesamiento de la imagen del campo de visión de un sistema de visión de ese tipo.

15 Indicadores integrados de las condiciones del entorno para monitorización de la estabilidad: las condiciones ambientales tales como la temperatura y humedad se pueden monitorizar mediante compuestos coloreados sensibles a dichos factores. Los compuestos seleccionados experimentan un cambio de color irreversible cuando se someten a umbrales de temperatura y humedad, señalando un chip deficiente. Se pueden añadir directamente a las cámaras de reacción, al sustrato base o en la superficie de cubierta, bajo el campo de visión del detector. Se puede

20 usar con este fin una combinación de diferentes compuestos sensibles. Entre los ejemplos de dichos compuestos como compuestos sensibles a la temperatura, leucotintes, oxacina, violeta cristal lactona, fenoltaleína y similares. Las sales metálicas como compuestos sensibles a la humedad: cloruro de cobalto, sulfato de calcio, y similares. Compuestos de N-óxido o nitrosos, como compuestos sensibles a la temperatura y humedad al mismo tiempo.

25 Esto permitirá que el dispositivo de medida (como el coagulómetro portátil) informe al paciente que la tira reactiva no ha pasado el control de calidad y debe descartarse.

Control de calidad externo: se pueden usar plasmas calibrados con tiempos conocidos de coagulación que estén comercialmente disponibles para llevar a cabo calibraciones de pruebas INR y PT, constituyendo un control de

30

calidad externo, de forma que se pueda evaluar en su conjunto el sistema coagulómetro portátil. En estas realizaciones, el sistema de visión artificial se ajusta para permitir la detección de los plasmas fluidos. Aunque el plasma es un fluido casi transparente, puede requerirse un pequeño ajuste del sistema de iluminación LED y del procesamiento de imagen para rastrear eficazmente el flujo de plasma, ya que el plasma en movimiento se reconoce como una sombra gris que avanza por un canal brillante.

35

Código de barras impreso: código impreso que lleva, entre otros, información relevante con respecto a datos de calibración, trazabilidad y fecha de caducidad. Se pueden imprimir matrices de datos de trazabilidad normalizadas y códigos de caducidad de dimensiones milimétricas habituales en este tipo de tiras reactivas en una de las capas de cubierta del chip o en una etiqueta transparente.

40

Los medios apropiados de detección y/o monitorización descritos arriba están ubicados en un dispositivo externo (coagulómetro) que contiene una ranura para insertar el dispositivo microfluídico de la invención y está diseñado para cooperar con dicho dispositivo microfluídico.

45 Adicionalmente, el dispositivo externo comprende medios para el procesado de los datos generados por los medios de detección y/o monitorización y produce una señal de salida a un medio de visualización

#### *Fabricación*

50 El presente dispositivo microfluídico puede ser fácilmente fabricado gracias a las tecnologías actuales de replicación de plásticos y las técnicas de ensamblaje. El ensamblaje se realiza mediante el sellado de dos sustratos: El sustrato inferior, donde se estampan las microestructuras y el sustrato superior o tapa, como se ilustra en la figura 1.

Los materiales apropiados para el sustrato inferior y para la tapa del dispositivo entran en el intervalo de los polímeros,

55

termocomformables y/o termoplásticos con buenas propiedades ópticas y con buena estabilidad dimensional. Por ejemplo, se pueden usar COC, PMMA, PC, PSU, SAN, PETG, PS y PP.

La mayor parte de materiales poliméricos son de naturaleza hidrófoba. Por tanto, si se escoge un material fuertemente hidrófobo como sustrato estampado, será necesaria una etapa de producción posterior para volver

60

hidrófilas algunas superficies, como se ha explicado antes. Por esta razón, se recomiendan plásticos hidrófilos, o que al menos no sean hidrófobos (ángulo de contacto  $< 90^\circ$ ).

Este es el caso de PMMA, acetato de celulosa, PC, COC y PS, entre otros materiales bien conocidos. un material especialmente preferido es PMMA, a la vista de su buen ángulo de contacto, propiedades ópticas y estabilidad

65

dimensional.

El sustrato inferior puede ser fácilmente replicado dentro de un intervalo de tecnologías, disponibles hoy en día, y con precisiones muy altas, permitiendo las bajas tolerancias de las microcaracterísticas. La técnica actual más relevante para dicho paso de estampación es el moldeado mediante microinyección, estampado de precisión en caliente y la impresión en litografía suave.

El proceso de sellado se puede realizar con una serie de técnicas bien conocidas como el pegado por compresión térmica, el pegado por adhesivo, el pegado mediante tratamiento de plasma, pegado con ultrasonidos, soldadura láser y otras.

10

La cubierta es preferiblemente una película hidrófila. Es preferiblemente transparente, para permitir la monitorización con precisión del flujo de fluido. Como se ha explicado anteriormente, las películas hidrófilas proporcionan medios muy económicos que permiten a la vez el sellado y la hidrofiliación de los canales, evitando la etapa de tratamiento superficial. En ese caso, la técnica de producción consiste un procedimiento de laminación normalizado, que puede

15 necesitar control de presión y temperatura. Otras técnicas de producción son los procedimientos de estampado o compresión.

Como se ha descrito anteriormente, las cámaras de reacción pueden combinar compuestos reactivos secos con varios fines. El compuesto principal es tromboplastina para iniciar la cascada de coagulación. Debido a las pequeñas dimensiones de la cámara de reacción, se pueden agregar compuestos de alto rendimiento sin aumentar significativamente el coste de producción.

20

Los productos recombinantes de tromboplastina humana tienen propiedades muy útiles en términos de solubilización y sensibilidad debido a su pureza química. La primera propiedad ha sido tradicionalmente potenciada mediante el uso de aditivos específico. Con el diseño de la presente invención, puede dispensarse una fracción de microlitro de factor recombinante humano, mostrando resultados excelentes en términos de solubilización y sensibilidad.

25

Numerosos agentes adicionales tienen un papel en el funcionamiento adecuado del reactivo seco. Pueden emplearse no solo para una solubilización rápida, sino también para control de los parámetros de difusión, mejorar las etapas de fabricación y la estabilidad del reactivo, o para resolver los siguientes problemas:

30

a) Modular la recaptación del líquido en el reactivo seco: polímeros simples tales como hidroxilpropilcelulosa, alcohol de polivinilo, polietilenglicol y similares.

35

b) Solubilización rápida, estabilizantes y acortamiento del proceso de secado: albúmina, glutamato, sacáridos, (tales como glucosa, sacarosa, trehalosa, etc.), y similares.

c) Humectabilidad controlada: Triton, Macol, Tetric, Silwet, Zonyl, Pluronic, y similares.

40

d) Indicación de color para monitorizar la estabilidad y para el control de la dispensación: leucotintes como compuestos sensibles a la temperatura (oxacina, violeta cristal lactona, fenoltaleína y similares). Sales metálicas como compuestos sensibles a la humedad tales como cloruro de cobalto, sulfato de calcio, y similares. Compuestos de N-óxido o nitrosos, como compuestos sensibles a la temperatura y humedad al mismo tiempo.

45

e) Potenciar la estabilidad de las condiciones ambientales: compuestos organomercurícos tales como Thimerosal y similares.

f) Otros compuestos con funciones variadas: Polybrene (agente antiheparina) y tampones ("buffers").

50

Los reactivos secos se pueden aplicar a la cámara de reacción o alternativamente al sustrato de cubierta, mediante un conjunto de técnicas bien conocidas: dispensación de gotas de líquido, dispensación de gel, dispensación en chorro, impresión serigráfica, revestimiento con cuchilla, pulverización selectiva y moldeo de película por colada. La etapa de dispensación va seguirá de una etapa de secado.

55

Preferiblemente, el reactivo líquido se dispensa en estado líquido sobre la cámara de reacción formando una gotita que ocupa la mayor parte de la cámara que tras secarse se convierte en una capa fina de reactivo seco.

Ventajosamente, tanto el procedimiento de fabricación y el chip (tira reactiva) así fabricado son muy simples, no se necesitan componentes integrados, como electrodos, ni ningún tipo de estructura multicapa. Por ello, las técnicas de fabricación presentadas permiten un coste de producción bajo, por lo que se puede producir dispositivos desechables baratos.

60

La presente invención, por su diseño microfluídico, proporciona medios muy sensibles y precisos para determinar el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación (como el tiempo de protrombina) se refiere al momento en que las moléculas de fibrina insolubles comienzan a polimerizar, esto último produce una "malla" que forma el coágulo. La

65

formación de polímeros de fibrina, típicamente del orden de unos pocos micrómetros, lleva a un aumento brusco de la viscosidad aparente de la sangre fluida, especialmente cuando la sección transversal del canal es estrecha como en el presente diseño microfluídico. En términos de precisión y sensibilidad, este dispositivo ofrece las ventajas anteriormente mencionadas con respecto a los dispositivos anteriores para determinar el tiempo de coagulación.

5

Además, la combinación de chip y dispositivo de medida de la invención proporciona ventajas combinadas. El uso de un medio de detección óptica único permite combinar simultáneamente la detección de los cambios en el flujo de fluido y diferentes controles de calidad. Esto significa que el dispositivo de medida portátil será menos complejo y más compacto, usando componentes normalizados. De hecho, el dispositivo de medida puede tener el tamaño de un teléfono móvil. También presenta una mejora significativa en la precisión y sensibilidad respecto de los dispositivos anteriores, especialmente los basados en el flujo de sangre, puesto que la monitorización del flujo se realiza de forma continua con una elevada frecuencia de monitorización. De esta forma, se puede determinar con precisión el preciso instante en el que la formación del coágulo tiene el primer efecto retardador sobre el flujo sanguíneo.

10

Como reconocerán los expertos en la técnica, los innovadores conceptos descritos en la presente solicitud se pueden modificar y variar en una amplia gama de aplicaciones.

15

Según esto, el alcance de la materia patentada no debe limitarse a cualquiera de los ejemplos didácticos específicos explicados, sino que en su lugar está definida por las siguientes reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe tomarse como una limitación en el alcance de las mismas.

20

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre o plasma, comprendiendo dicho dispositivo:
- 5
- medios (1) para introducir una muestra de dicho medio fluido; acoplados a un canal capilar de distribución (2) y
  - una primera región (6a), acoplada a dichos medios (1) para introducir una muestra, para permitir que dicho medio fluido fluya a lo largo de la longitud de dicha primera región;
- 10
- una primera zona (5a) al comienzo de dicha primera región conteniendo un reactivo que puede reaccionar con dicho medio fluido;
  - una segunda región (6b), también acoplada con dichos medios (1) para introducir una muestra, para permitir que dicho medio fluido fluya a lo largo de una longitud de dicha segunda región;
  - en el que dicha segunda región (6b) no contiene un reactivo que puede reaccionar con dicho medio
- 15 fluido o
- en el que existe una segunda zona (5b), al comienzo de dicha segunda región (6b) que contiene un reactivo que puede reaccionar con dicho medio fluido, que es diferente del reactivo de la primera zona (5a); caracterizado porque cada una de dichas regiones (6a) y (6b) comprende, en orden desde el canal de distribución (2), en primer lugar las zonas (5a) y (5b) y al menos un canal microfluídico que es la zona de barrido (8).
- 20
2. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque cada una de dichas regiones (6a, 6b) consiste en al menos un canal microfluídico.
3. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dichos canales
- 25 microfluídicos (6a, 6b) son canales capilares, en el que las superficies de dichos canales son hidrófilas y la capilaridad actúa como la única fuerza para mover el medio fluido.
4. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque cada una de dichas regiones contiene medios (7) de ventilación.
- 30
5. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 4, consistiendo dichos medios de ventilación en un puerto de ventilación (7) que funciona como una válvula de retención de flujo.
6. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicha
- 35 primera zona de dicha primera región consiste en una celda de reacción (5a) que contiene un reactivo que puede iniciar la coagulación de dicho medio fluido.
7. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque dicha segunda zona de dicha segunda región consiste en una celda de reacción (5b) que contiene un
- 40 reactivo que puede inhibir la coagulación de dicho medio fluido.
8. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque dicho dispositivo comprende además una tercera región, también acoplada con dichos medios (1) para introducir una muestra, para permitir que dicho medio fluido fluya a lo largo de una longitud de dicha tercera región,
- 45 en el que al comienzo de dicha tercera región existe una tercera zona que contiene un reactivo que puede reaccionar con dicho medio fluido que es diferente del reactivo de la primera (5a) o segunda (5b) zona.
9. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dichos medios para introducir una muestra consisten en un puerto de entrada (1) acoplado con dichas
- 50 regiones primera y segunda (6a, 6b), y con la tercera región si está presente, por medio de un canal de distribución (2) seguido por una bifurcación de canal (3) que divide (4) en dichas regiones primera, segunda y tercera opcional.
10. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque dichas regiones primera, segunda y tercera opcional (6a, 6b) tienen una forma curvada.
- 55
11. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dichas regiones primera, segunda y tercera opcional (6a, 6b) consisten en canales que tienen una trayectoria en forma serpenteante.
- 60
12. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque los canales tienen una sección transversal rectangular.
13. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque los canales consisten en una combinación de segmentos de diferentes secciones transversales.
- 65



14. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicho reactivo en la zona (5a) es tromboplastina y dicho tiempo de coagulación representa el tiempo de protrombina.
- 5 15. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha primera región actúa como un canal de coagulación (6a) y dicha segunda región actúa como un canal de control (6b) y porque cada una de las dos regiones tiene una estructura idéntica.
16. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado  
10 porque dicha primera región actúa como un canal de coagulación (6a) y dichas regiones segunda y tercera actúan como canales de control, y porque cada una de las tres regiones tiene una estructura idéntica.
17. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, que comprende además características ópticas para el control de calidad.
- 15 18. Un dispositivo coagulómetro que comprende:
- una ranura para introducir un dispositivo microfluídico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17;
  - medios ópticos para detectar y/o monitorizar de manera continua la posición del frente de dicho medio  
20 fluido en cada una de dichas regiones y/o su velocidad; y
  - medios para procesar los datos entregados por dichos medios de detección y/o monitorización y para la determinación del tiempo de coagulación de dicho medio fluido, en el que los medios ópticos también miden o leen las características de control de calidad en el dispositivo microfluídico.
- 25 19. Un dispositivo coagulómetro de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque dichos medios de procesamiento incluyen medios para comparar dicha propiedad o propiedades en cada una de las dos o tres regiones.
- 30 20. Un dispositivo coagulómetro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, caracterizado porque dichos medios de procesamiento incluyen medios para detectar el punto en el tiempo en el que la diferencia entre dicha propiedad o propiedades en el primer canal (6a) y dicha propiedad o propiedades en el segundo canal (6b) y/o tercer canal alcanza un umbral predeterminado.
- 35 21. Un dispositivo coagulómetro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizado porque dichos medios de detección y/o monitorización incluyen medios para iluminar cada una de dichas regiones y medios para analizar la luz transmitida o reflejada por cada una de dichas regiones.
22. Un dispositivo coagulómetro de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado porque dichos medios  
40 de iluminación comprenden al menos un LED y dichos medios de análisis comprenden al menos un sensor óptico.
23. Un dispositivo coagulómetro de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado porque dichos medios de análisis incluyen al menos una lente.
- 45 24. Un procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre o plasma que comprende las siguientes etapas:
- introducir una muestra de dicho medio fluido en un dispositivo microfluídico de acuerdo con las  
50 reivindicaciones 1-17 que tiene las regiones primera y segunda (6a, 6b) en el que se le permite fluir a lo largo de una longitud;
  - proporcionar al comienzo de dicha primera región (6a) en la zona (5a) un primer reactivo (5a) que puede reaccionar con dicho medio fluido; y
  - no proporcionar en dicha segunda región (6b) en la zona (5b) ningún reactivo o bien proporcionar un  
segundo reactivo (5b) diferente del primer reactivo (5a) en dicha primera región (6a),
  - 55 - monitorizar de manera continua con medios ópticos al menos una propiedad de dicho medio fluido en dicha primera región (6a) y dicha segunda región (6b),
  - comparar al menos una propiedad de dicho medio fluido en dicha primera región (6a) con al menos la misma propiedad de dicho medio fluido en dicha segunda región (6b) o con un valor teórico de esta propiedad.
- 60 25. Un procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre o plasma de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque la comparación de al menos dicha propiedad de dicho medio fluido en dicha primera región se realiza con al menos una propiedad de dicho medio fluido en dicha segunda región (6b).
- 65 26. Un procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre

o plasma de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque la comparación de al menos dicha propiedad de dicho medio fluido en dicha primera región se realiza con un valor teórico para dicha propiedad.

27. Un procedimiento para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre o plasma de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, caracterizado porque el procedimiento incluye una etapa de control de calidad que comprende correlacionar dichas propiedades monitorizadas con las curvas teóricas.

28. Un procedimiento de fabricación de un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, para la determinación del tiempo de coagulación en un medio fluido tal como sangre o plasma que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un primer sustrato;
- estampar en dicho primer sustrato una microestructura que corresponde a un dispositivo microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
- 15 - proporcionar un segundo sustrato; y
- sellar dicho segundo sustrato en la parte superior de dicho primer sustrato estampado, de modo que dicho segundo sustrato actúa como una tapa de cubierta.

29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho segundo sustrato es una película hidrófila.

**Fig. 1**

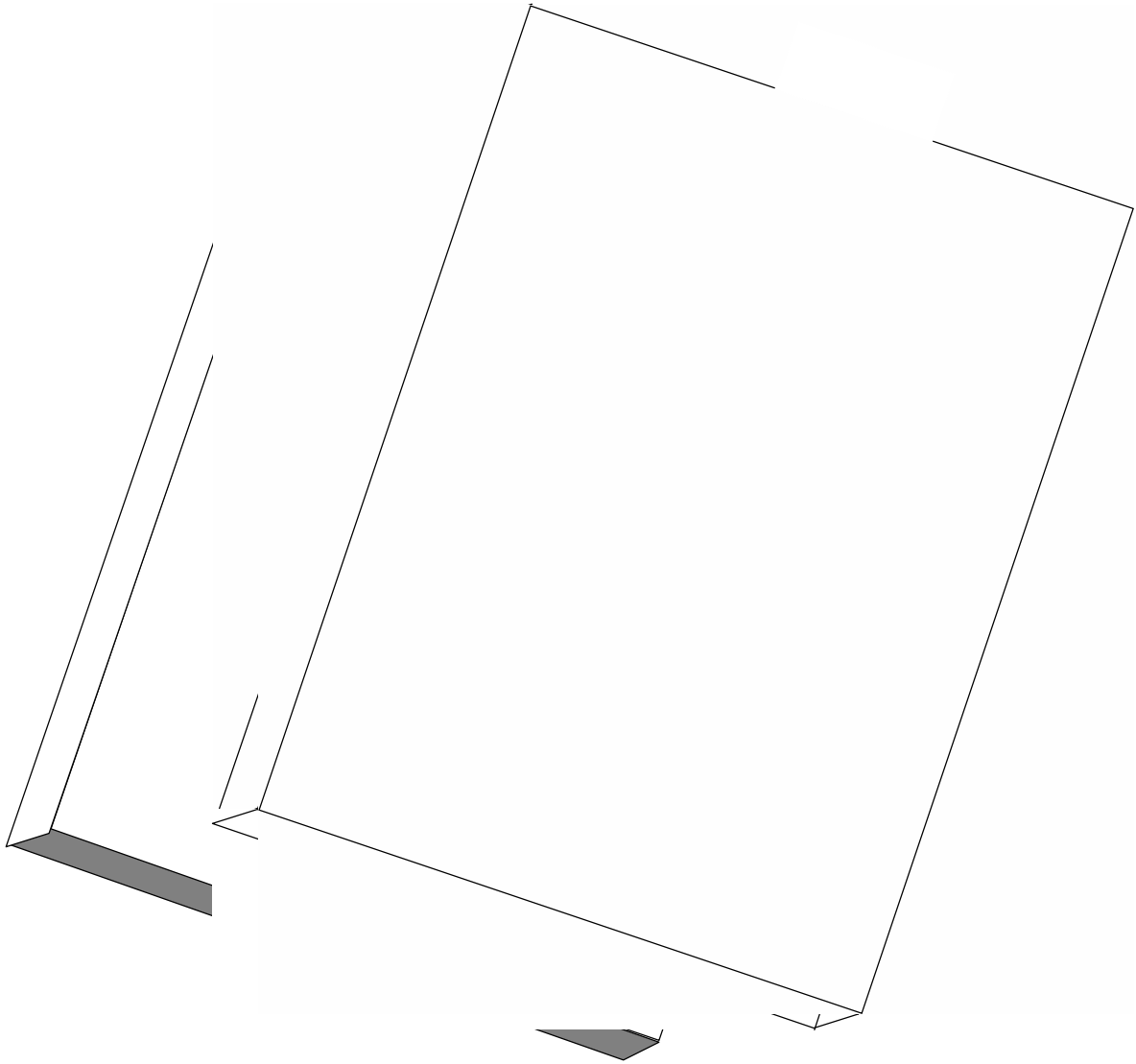


Fig. 2

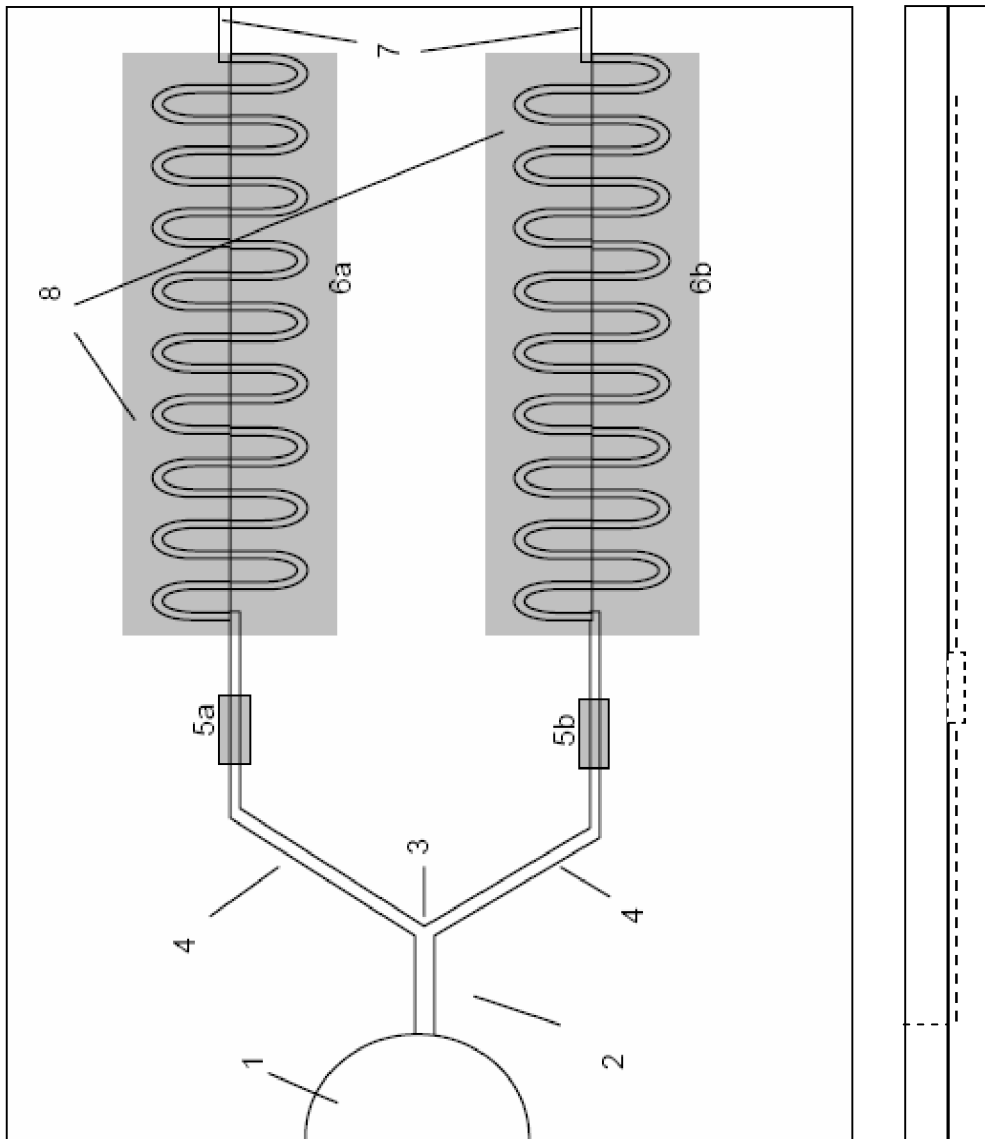


Fig. 2A

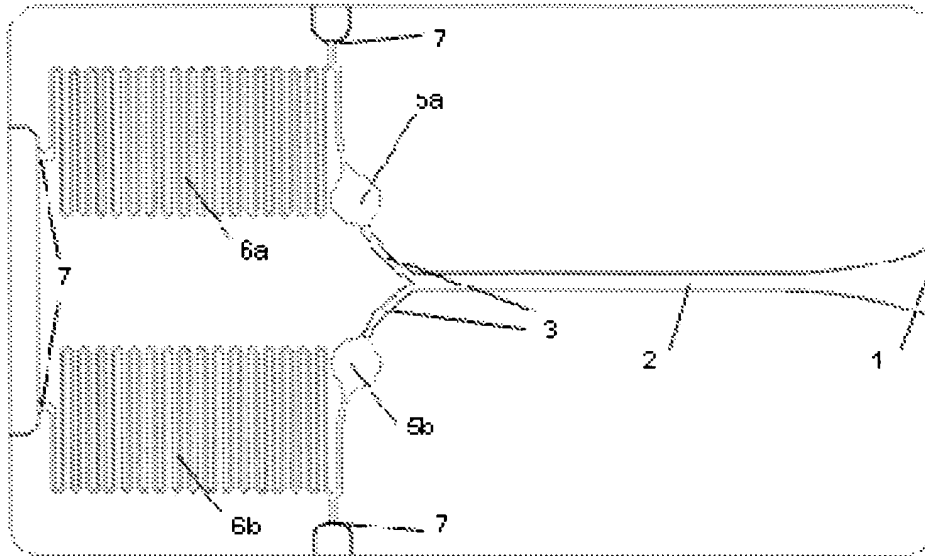


Fig. 3

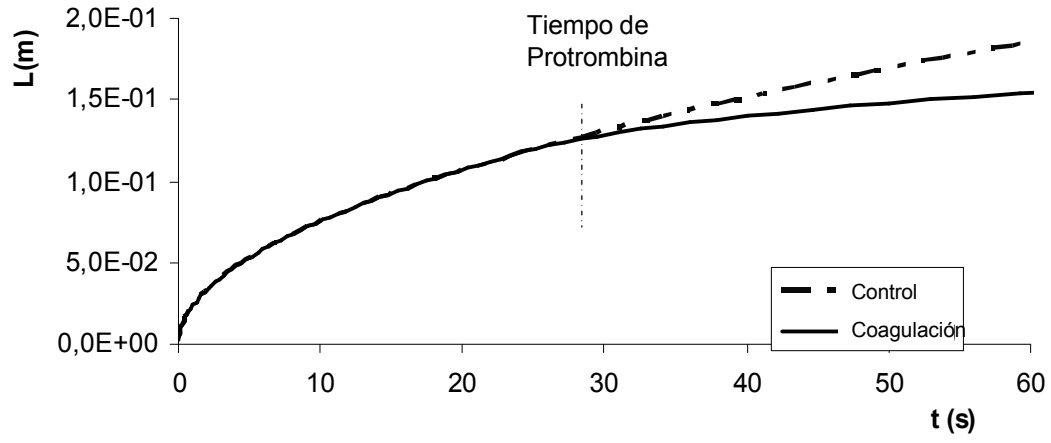


Fig. 4

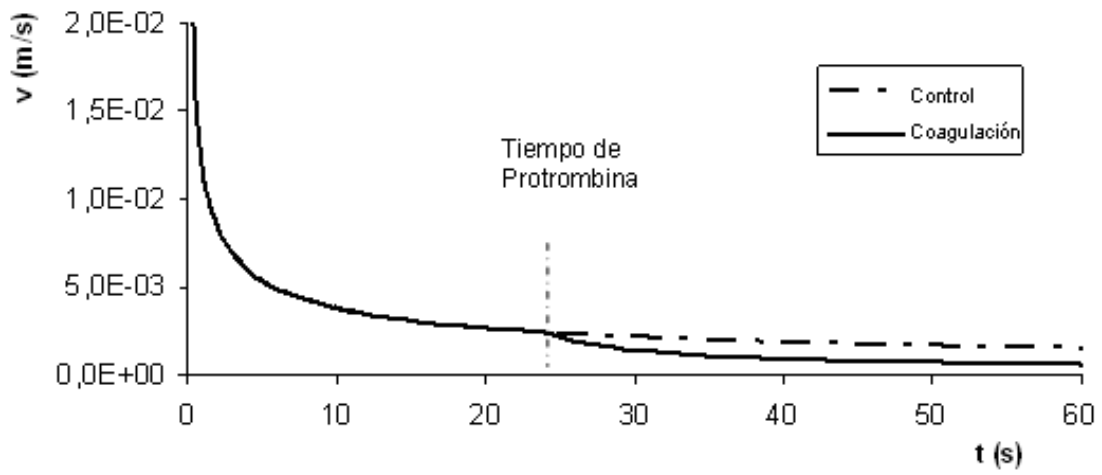


Fig. 5

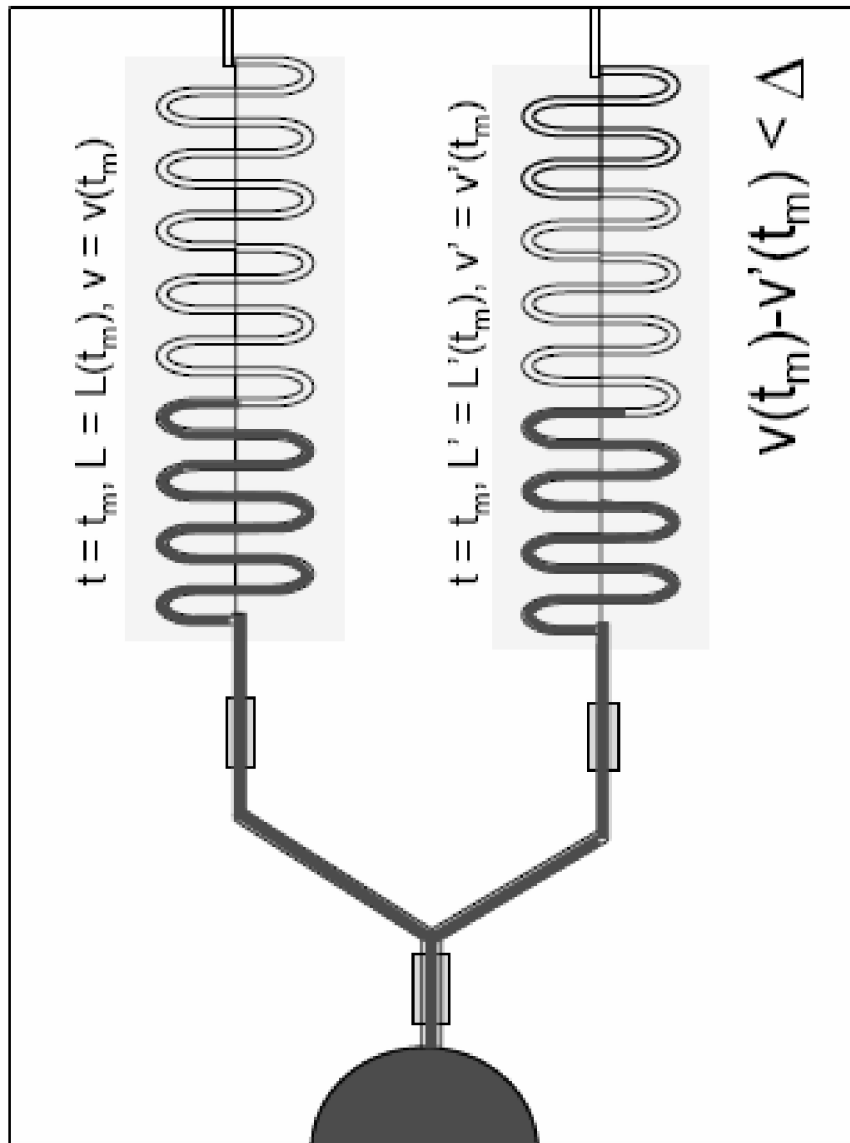


Fig. 6

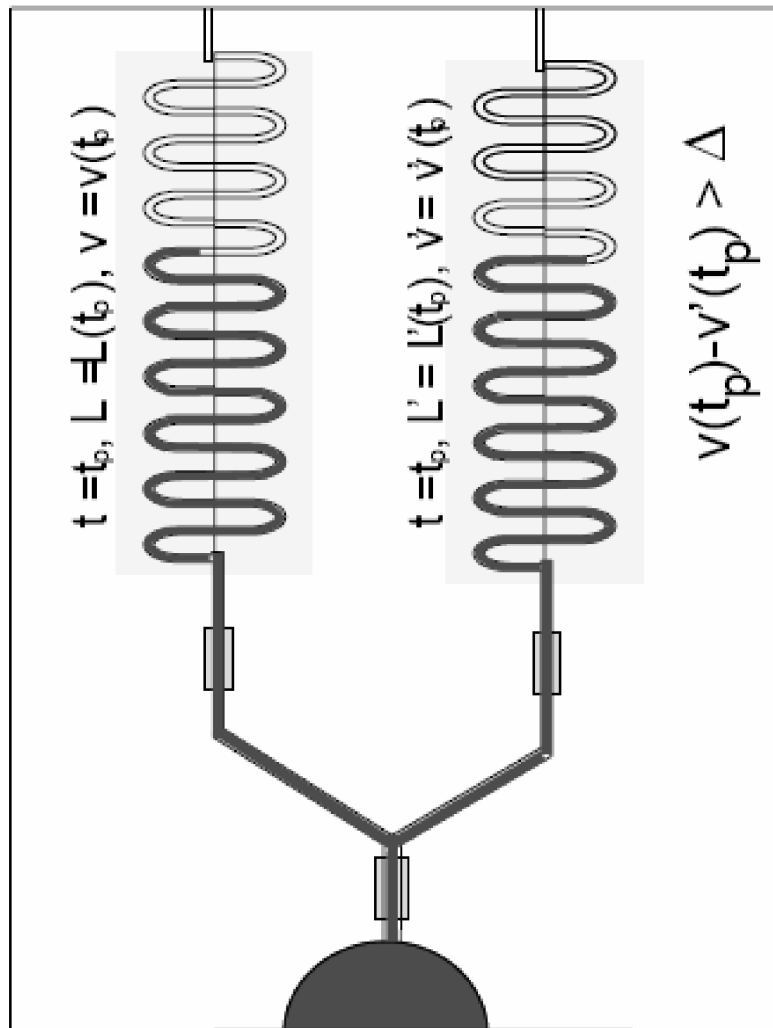
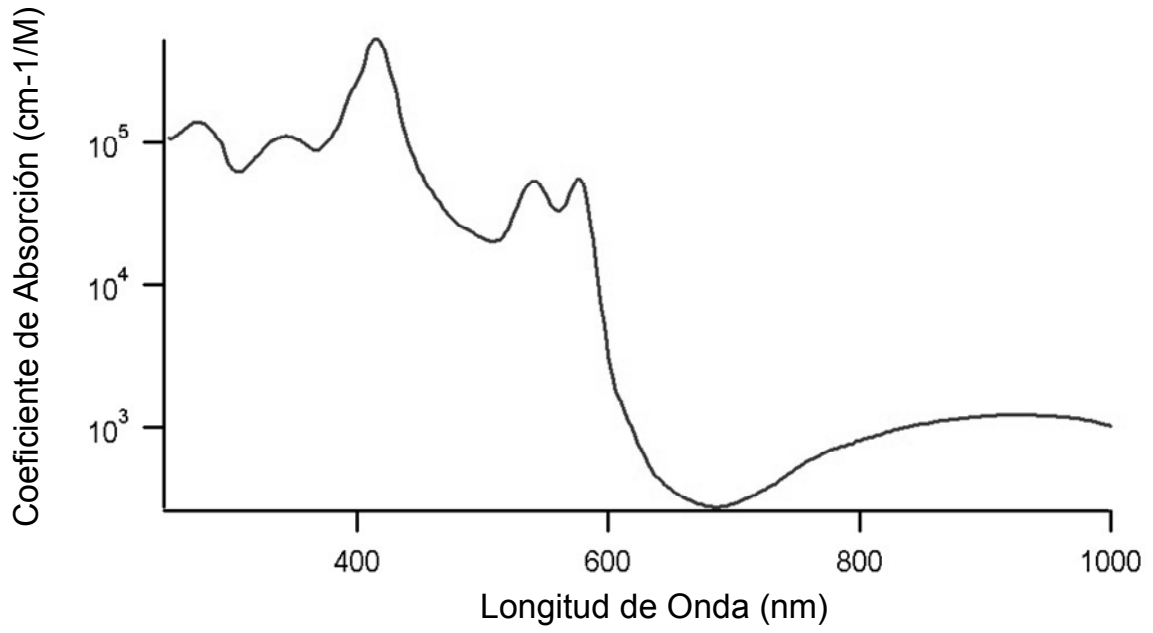
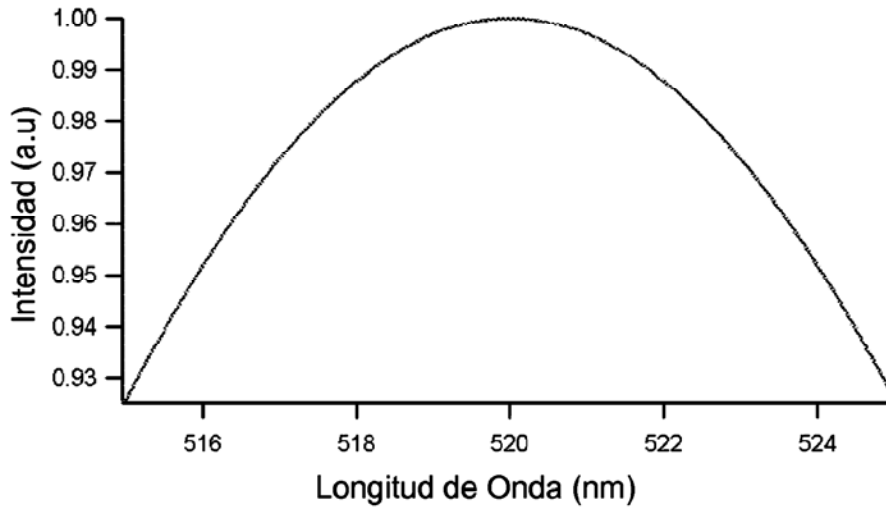




Fig. 7

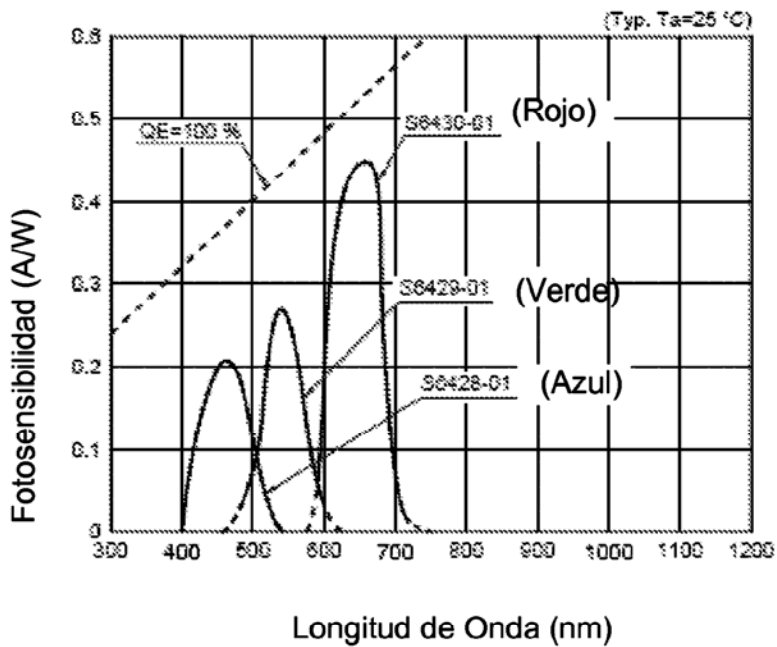


**Fig. 8**

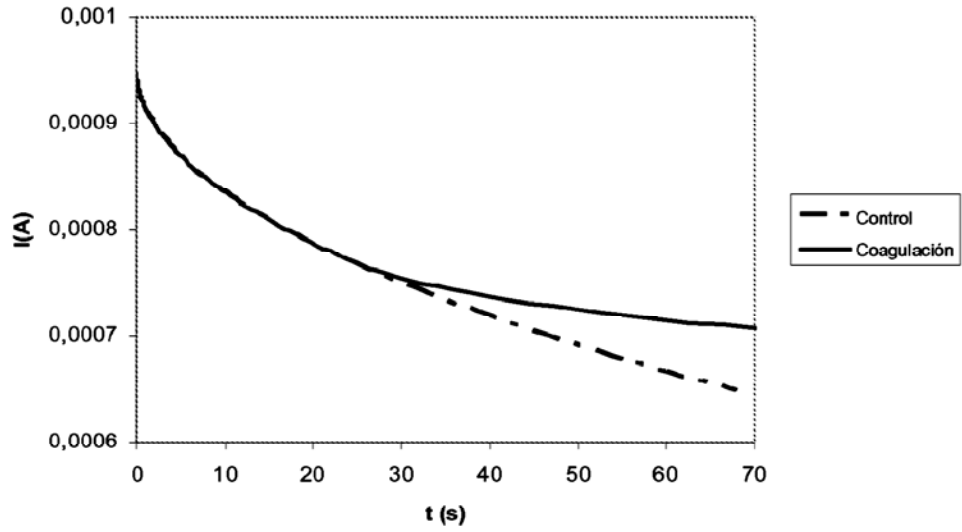


**Fig. 9**

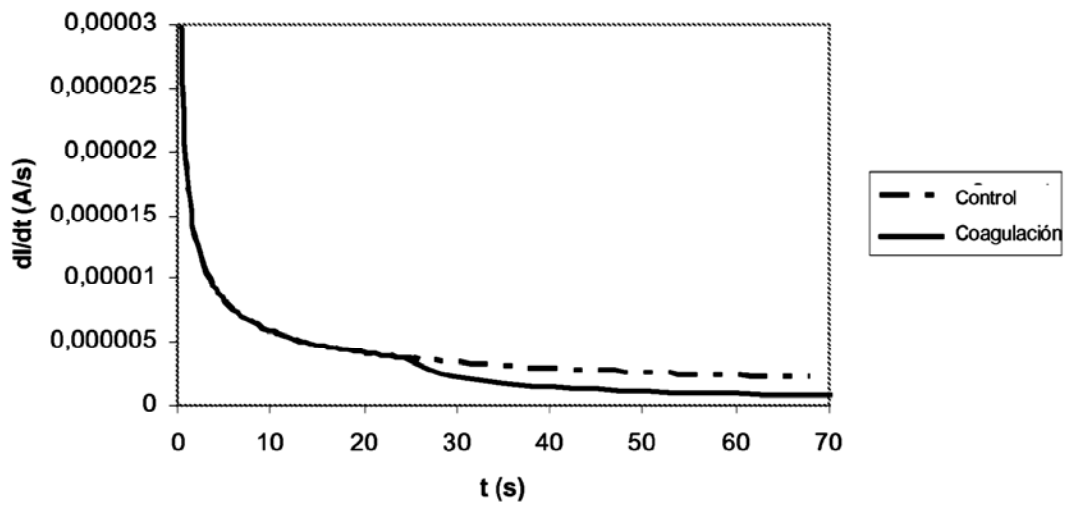
■ Respuesta espectral (S6428-01, S6429-01, S6430-01)



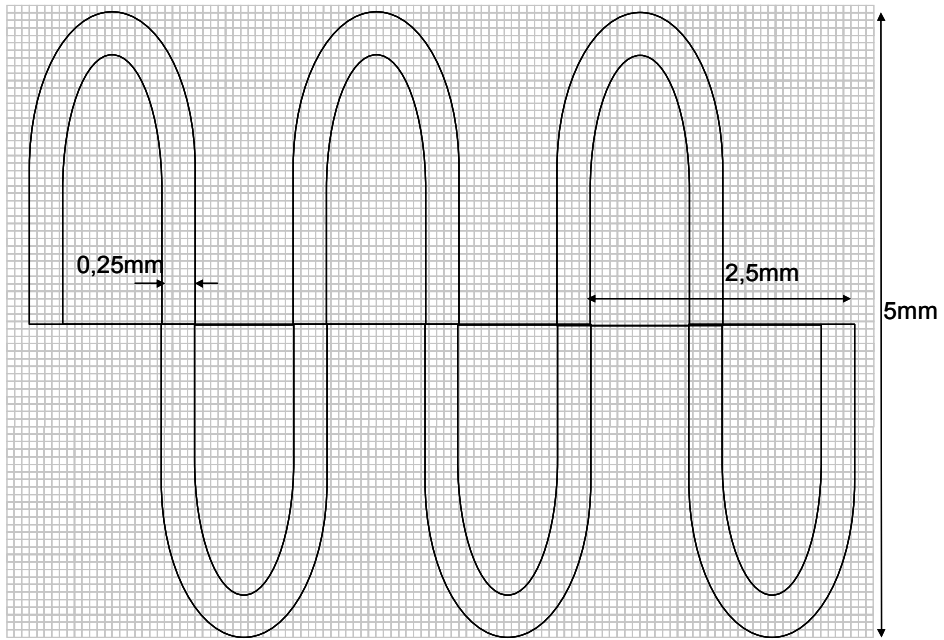
**Fig. 10**



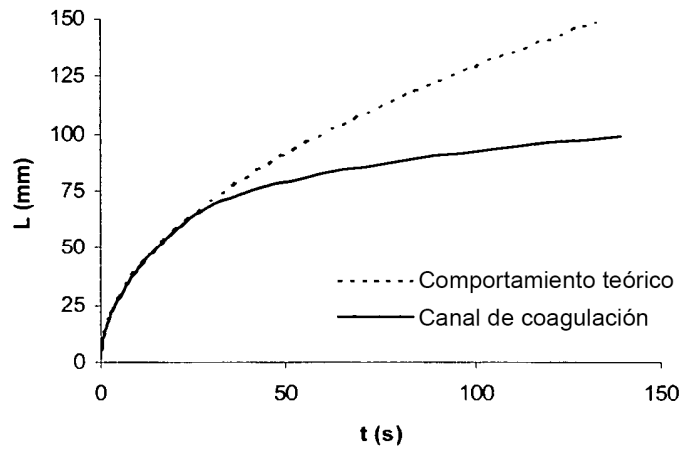
**Fig. 11**



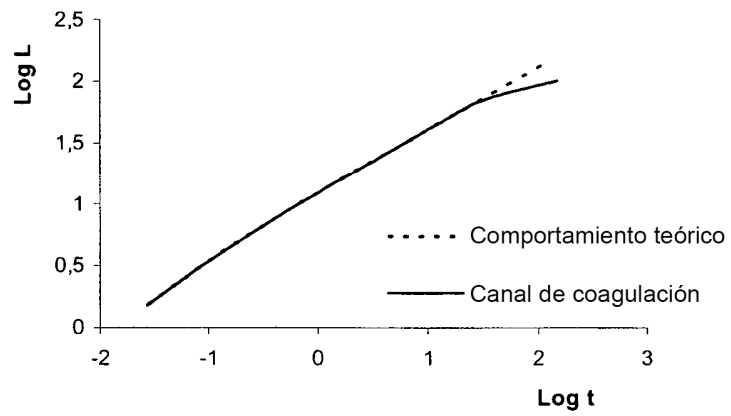
**Fig. 12**



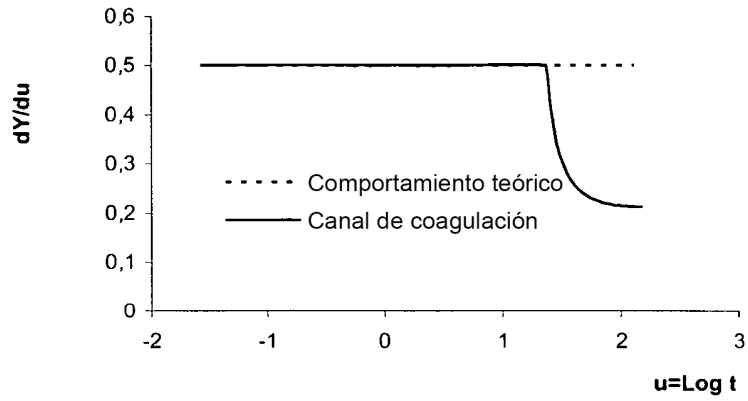
**Figura 13**



**Figura 14**



**Figura 15**



**Figura 16**

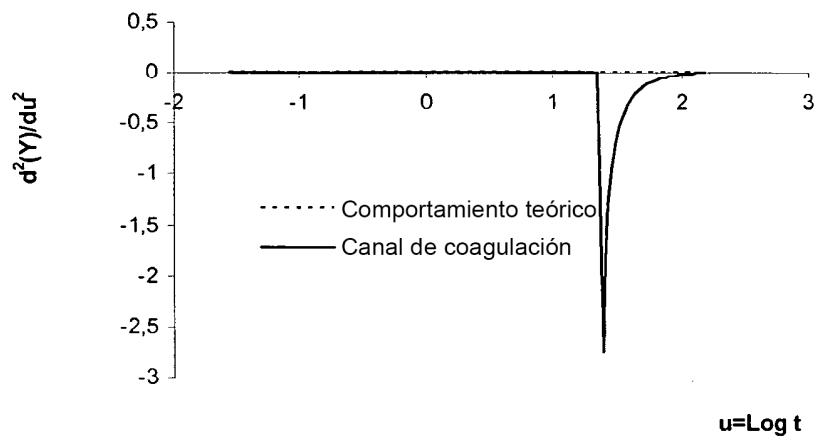


Figura 17

